

18 > Biofilmes na indústria alimentar

D. Rodrigues¹, E. de Martinis², P. Teixeira^{*}

¹IBB - Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal,

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Av. do Café s/n, Monte Alegre, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brasil

^{*}e-mail do autor correspondente: pilar@deb.uminho.pt

18.1 > Introdução

A presença de biofilmes é comum na indústria alimentar, encontrando-se em todos os tipos de superfícies existentes nas linhas de processamento de alimentos, desde plástico, vidro, metal e madeira, até aos próprios produtos alimentares. Apesar da formação de biofilme poder ter aplicações benéficas no âmbito desta indústria (por exemplo; é possível aumentar significativamente o rendimento de produção por processos de fermentação ao utilizar culturas microbianas imobilizadas pela formação de biofilmes, as quais são capazes de suportar altas concentrações de ácido e baixas concentrações de oxigénio frequentemente associadas aos processos de fermentação), a adesão das bactérias aos produtos alimentares ou às superfícies de contato com alimentos pode também causar sérios problemas de higiene e perdas económicas devido à deterioração dos alimentos. Além disso, é também reconhecida a persistência de vários agentes patogénicos

alimentares em superfícies de contato com os alimentos. Por estas razões, a presença de biofilmes nos sistemas alimentares é considerada um sério risco para a saúde pública em geral.

Um dos principais problemas da indústria alimentar consiste na sobrevivência dos patogénicos alimentares, ou dos microrganismos que causam a deterioração dos alimentos, devido a uma desinfecção insuficiente das superfícies ou instrumentos que entram em contato com os alimentos. Os biofilmes formados nessas superfícies são a principal causa de contaminação do produto final, tendo como consequências a rejeição do produto, perdas económicas e até mesmo doenças caso estejam envolvidos agentes patogénicos alimentares. Estudos recentes em relação à composição microbiana destes biofilmes revelaram que os mesmos são frequentemente formados por vários microrganismos e apontam os biofilmes contendo patogénicos como uma das principais causas de contaminação de produtos alimentares e transmissão

de doenças. Além disso, são ainda causadores de problemas consideráveis de contaminação cruzada e de contaminação pós-processamento. Por outro lado, os biofilmes são muitas vezes os responsáveis por bloqueios mecânicos e por interferências nos processos de transferência de calor, assim como pelo aumento da taxa de corrosão das superfícies. Em sistemas de água potável, por exemplo, podem provocar o entupimento das canalizações levando à diminuição da velocidade e da capacidade de carga, o que implica o aumento de utilização de energia (ver Capítulo 17). Similarmente, a formação de biofilmes em permutadores de calor e torres de arrefecimento pode reduzir a transferência de calor e a sua eficiência. Além disso, a capacidade das bactérias persistirem em biofilmes formados em superfícies metálicas das instalações de processamento pode ainda causar a corrosão da superfície devido à produção de ácido por parte das bactérias.

Devido a toda esta problemática em torno dos biofilmes formados nos produtos alimentares e nas superfícies de contato com alimentos, os mecanismos de formação de biofilmes microbianos na indústria de processamento alimentar têm-se tornado num tema fulcral nos últimos anos. Neste âmbito, o presente capítulo pretende apresentar aspetos gerais sobre os principais agentes patogénicos alimentares e suas implicações em diferentes setores industriais, dando particular ênfase à adesão e formação de biofilme por parte de *L. monocytogenes* e *Salmonella enterica* em superfícies de contato com alimentos.

18.2 > Patogénicos alimentares

A transmissão de agentes patogénicos por alimentos é um problema crescente para a saúde pública em todo mundo e essas doenças são

causadas principalmente por bactérias, vírus, parasitas e contaminantes químicos. Além disso, as perdas económicas decorrentes das doenças transmitidas por alimentos são da ordem de bilhões de dólares anualmente. Milhões de crianças de países em desenvolvimento morrem em consequência de doenças diarreicas causadas por microrganismos, principalmente de transmissão hídrica e alimentar. Em países industrializados, estima-se que anualmente, uma em cada três pessoas seja afetada por doenças transmitidas por alimentos.

Segundo o Centro de Controlo de Doenças e Prevenção (CDC), dos 48 milhões de doenças estimadas por ano, 9,4 milhões são devidas a 31 agentes patogénicos conhecidos de origem alimentar. Os restantes 38 milhões resultam de agentes de doenças não especificadas, que incluem agentes conhecidos, sem dados suficientes para serem feitas estimativas específicas, agentes ainda não reconhecidos como causadores de doença de origem alimentar e agentes ainda não descobertos. Nos Estados Unidos, de entre as doenças transmitidas por alimentos contaminados com patogénicos conhecidos a *Salmonella* foi a principal causa de internamento e de morte, responsável por cerca de 28% das mortes e 35% das hospitalizações; cerca de 90% das doenças estimadas, hospitalizações e mortes foram devidas a sete agentes patogénicos - *Salmonella*, norovírus, *Campylobacter*, *Toxoplasma*, *E. coli* O157, *Listeria* e *Clostridium perfringens* - e cerca de 60% das doenças estimadas, mas numa proporção bem menor de doença grave, foi causada por norovírus. Como consequência, os programas de controlo da qualidade microbiológica estão, cada vez mais, a ser aplicados ao longo de toda a cadeia alimentar, com o intuito de se minimizar o risco de infeção para o consumidor.

BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

Salmonella spp. é um bastonete do género das enterobactérias, é oxidase-negativa e catalase-

positiva. *Salmonella typhi* é o agente da febre tifóide, enquanto linhagens não tifóides podem causar principalmente enterocolite caracterizada por febre aguda, dor abdominal, diarreia, náuseas e vômitos ocasionais. Os principais alimentos associados a enterocolites por *Salmonella* são os ovos; carnes de vaca, aves, peru e frango; peixes; presunto e salsichas. Atualmente existem mais de 2500 tipos serótipos conhecidos de *Salmonella*, mas *Salmonella enterica* serótipos Enteritidis e Typhimurium são os mais comumente associados a enterocolites. A incidência de *Salmonella* entre os diversos países é muito variável: em alguns países, esta bactéria não foi detectada, enquanto outros países tiveram prevalência de até 80%. Durante várias décadas, o serótipo Typhimurium foi o serótipo predominante, no entanto, *S. Enteritidis*, tem sido referido como um importante serótipo em infecções humanas e em contaminação de galinhas. Considera-se que a maioria dos surtos estão associados à contaminação cruzada e tratamento térmico inadequado, fortemente associado ao uso de ovos crus e que ocorrem mais provavelmente na primavera e verão. Tem sido destacado o aparecimento de novas estirpes de *Salmonella* multirresistentes a antibióticos, o que constitui um grave problema de saúde pública em grande parte do mundo e que enfatiza a importância de programas de vigilância e controlo eficientes.

Campylobacter sp. é reconhecida em muitos países como a principal causa de gastroenterite bacteriana de origem alimentar em seres humanos. É um género de bactéria móvel, com flagelos uni ou bi-polares, tem uma forma um pouco curvada, o aspeto de bastonete e é oxidase-positiva. Pelo menos uma dezena de espécies de *Campylobacter* tem sido associada a doenças no Homem, sendo as mais comuns *C. jejuni* e *C. coli*. A maioria dos casos de infecções entéricas causados por *Campylobacter* é causada por *C. jejuni* (80-90%), ocorrendo principalmente como casos esporádicos. Carnes de aves, água e produtos

lácteos não pasteurizados são os veículos mais importantes para a infeção por *Campylobacter* spp.. A contaminação cruzada de alimentos é muito comum, pois *Campylobacter* spp. está presente no trato intestinal de muitos animais, passando depois para as suas fezes e se não forem adotadas medidas adequadas de controlo pode ocasionar a infeção em seres humanos.

E. coli é membro da família *Enterobacteriaceae*, abundante em fezes humanas e de animais e geralmente não se encontra noutros nichos sendo, por isso, utilizada como um indicador de contaminação fecal. A maior parte dos serótipos de *E. coli* não é patogénica, mas há um grupo de *E. coli* enterovirulento: *E. coli* enterotoxigénica - ETEC, *E. coli* enteropatogénica - EPEC, *E. coli* enteroinvasora - EIEC e *E. coli* enterohemorrágica - EHEC. Para a segurança de alimentos, *E. coli* enterohemorrágica, serótipo O157:H7, é a uma das mais preocupantes. *E. coli* O157:H7 produz uma poderosa toxina que pode causar doenças muito graves, nomeadamente um quadro agudo de colite hemorrágica, causando danos muito sérios na mucosa intestinal. Os pacientes apresentam cólicas abdominais intensas e diarreia, inicialmente líquida, mas que se torna hemorrágica na maioria dos pacientes. Ocasionalmente ocorrem vômitos e a febre é baixa ou ausente. Alguns indivíduos apresentam somente diarreia líquida. Esta bactéria foi encontrada no intestino de gado saudável, veados, cabras e ovelhas e constitui uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos.

BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS

Listeria monocytogenes é um patogénico de origem alimentar que constitui uma grande preocupação para a indústria alimentar. É uma bactéria móvel por meio de flagelos e que pode ser amplamente encontrada em produtos alimentares, incluindo matérias-primas (leite, carne, queijo, farinha e outros) e produtos acabados que podem ter sido contaminados pós-

processamento. *L. monocytogenes* causa a listeriose, cujas manifestações incluem septicemia, meningite (ou meningoencefalite), encefalite, úlcera da córnea, pneumonia e infecções intrauterinas ou cervicais em mulheres grávidas, o que pode resultar em abortos espontâneos (2º-3º trimestre) ou em nados-mortos. Mais recentemente, também têm sido associados casos de gastroenterite a infecções por *L. monocytogenes*. A listeriose em humanos é rara, com menos de dez casos por um milhão de pessoas, no entanto é preocupante devido à sua elevada taxa de letalidade de cerca de 20%. Este microrganismo é capaz de multiplicar-se em temperaturas de refrigeração (tão baixas como - 1,5 °C), em concentrações de sal até 30% e em valores de pH abaixo de 5,0. Estas características contribuem para a sua sobrevivência em condições que são normalmente usadas para se controlar o crescimento de patogénicos nos alimentos.

Bacillus cereus é uma bactéria aeróbia facultativa, formadora de esporos, causadora de dois tipos de doenças gastrointestinais: (i) diarreica, que é causada por uma proteína de peso molecular elevado, termo-lábil e (ii) emética, causada por uma proteína de baixo peso molecular – um péptido termo-estável denominado cereulida. Os surtos alimentares por este patogénico têm sido associados a alimentos como carne, peixes, vegetais, arroz, leite, queijos, massas e alimentos com molhos (pudins, assados, saladas).

Staphylococcus aureus é um dos principais agentes de gastroenterite resultante do consumo de alimentos contaminados. É uma bactéria esférica (coco) que aparece aos pares no exame microscópico, em cadeias curtas ou em cachos similares aos da uva ou em grupos, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos, sem motilidade e catalase e coagulase positivas. *S. aureus* é capaz de crescer numa faixa ampla de temperaturas, concentrações de pH e de cloreto de sódio (até 15% de NaCl). Os alimentos que são frequentemente responsáveis por intoxicações

alimentares por *S. aureus* incluem produtos de carne, aves e ovos, saladas, produtos de panificação (principalmente bolos com natas ou cremes de leite e ovos), recheios de sanduíche, leite e produtos lácteos. No entanto, normalmente, estes alimentos foram contaminados pelo Homem através de ferimentos nas mãos ou outras lesões, garganta ou nariz. Produz uma série de toxinas que, quando ingeridas, podem provocar vômitos, diarreia e mal-estar geral.

Clostrídeos são bacilos anaeróbios, formadores de esporos, amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados com frequência no solo, em legumes, verduras, frutas, intestino e fezes humanas e animais. As espécies de importância em Microbiologia de Alimentos são *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*. *Clostridium perfringens* pode causar doença diarreica pela produção de toxina, quando há ingestão de grande número de células vegetativas em alimentos, sendo comum em surtos causados por esta bactéria o envolvimento de carnes em pedaços grandes, mal cozidas e mantidas com alterações da temperatura. *Clostridium botulinum* é um bacilo flagelado, anaeróbio estrito, encontrado com frequência no solo, em legumes, verduras, frutas, fezes humanas e excrementos animais. Produz uma neurotoxina responsável pelo botulismo, que ocorre subitamente e se caracteriza por manifestações neurológicas decorrentes da inibição da transmissão de impulsos nervosos nas junções neuromusculares e apresenta elevada letalidade. Habitualmente adquire-se pela ingestão de alimentos contaminados, como enchidos e conservas em latas e vidros.

PATOGÉNICOS ALIMENTARES EMERGENTES

Há um elevado número de fatores envolvidos na emergência ou reemergência de patogénicos associados a doenças transmitidas por alimentos. Estes incluem fatores relacionados

1 com o ambiente, como as alterações climáticas
2 e a desflorestação; fatores relacionados com os
3 alimentos, tais como alterações na sua produção
4 (agricultura orgânica, confinamento de gado) e
5 nas práticas de distribuição; fatores relacionados
6 com o consumidor, tais como o aumento de
7 viagens internacionais, mudanças do perfil de-
8 mográfico (maior proporção de idosos, crianças,
9 imuno-comprometidos - por ex. portadores de
10 HIV, cancro, diabetes) e as mudanças nos hábitos
11 alimentares (preferência por alimentos minima-
12 mente processados) e, por último, os fatores
13 relacionados com os próprios patogénicos, tais
14 como alterações genéticas nos microrganismos
15 resultantes da exposição ao stress ambiental
16 e aumento da resistência aos antibióticos. Um
17 outro fator importante é o aumento da globaliza-
18 ção no fornecimento de alimentos, o que resulta
19 na transferência dos agentes patogénicos entre
20 os vários países. Além disso, o uso de antimicro-
21 bianos no tratamento de animais tem contribuí-
22 do para o aparecimento de estirpes bacterianas
23 resistentes a vários antibióticos. As potenciais
24 doenças devidas a patogénicos alimentares
25 incluem a hepatite, causada principalmente por
26 vírus; a gripe aviária, causada pelo vírus influen-
27 za (H1N1); a espiroquetose intestinal causada
28 por *Brachyspira pilosicoli*, uma micose cutânea
29 causada pela *Larva migrans* devida à migração
30 de larvas de ancilostomídeos na pele humana
31 quando a pele entra em contato direto com solo
32 contaminado ou areia e a anisakíase humana que
33 é uma parasitose gastrointestinal resultante da
34 ingestão acidental de larvas infeciosas de nemá-
35 todes da família *Anisakidae* (aumentou no Brasil
36 devido ao consumo de pescado cru na forma
37 de sushi e sashimi). Outros potenciais agentes
38 patogénicos emergentes incluem *Helicobacter*
39 spp. não-gástricas, a *Cronobacter* spp., espécies
40 de *Campylobacter* não-jejuni/coli, e *E. coli* não-
41 O157 produtoras da toxina Shiga. No caso da
42 *Cronobacter* spp., este patogénico oportunista
43 pode causar doença grave em recém-nascidos,

caracterizada por meningite, enterocolite necro-
sante, septicémia e morte. Este organismo já foi
isolado de vários alimentos e a sua presença em
fórmulas infantis desidratadas para alimentação
de recém-nascidos causa uma preocupação
especial.

Para se evitar a propagação destas doen-
ças emergentes transmitidas por alimentos é
necessária uma maior sensibilização para os
correspondentes agentes patogénicos, uma
melhor educação do consumidor, alterações na
produção dos alimentos e nas práticas de manu-
seamento desses alimentos desde a quinta até
à mesa, bem como uma melhoria dos métodos
de deteção microbiológica.

18.3 > Presença de biofilmes na indústria alimentar

A colonização das superfícies de processamento
de alimentos pode ocasionar diversos proble-
mas na indústria alimentar, tanto de ordem
económica como de saúde pública. A falta de
eficiência dos procedimentos de higienização
e limpeza permite a adesão de microrganismos
e, muitas vezes, o desenvolvimento de biofilmes
nessas superfícies, o que constitui uma potencial
fonte de contaminação dos alimentos. De fato,
sabe-se que as células em biofilme são até 1
000 vezes mais resistentes aos agentes antimi-
crobianos do que as células em suspensão, o
que agrava imenso este problema. Observou-se
que biofilmes de estirpes de *Pseudomonas aeru-
ginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*
são cerca de 10 a 100 vezes mais resistentes a
desinfetantes usados na indústria alimentar do
que células em suspensão.

Os biofilmes podem desenvolver-se nas tu-
bagens, nos drenos, em juntas, nos circuitos de
água e de esgotos, nos permutadores de calor,
nas superfícies de embalagem dos produtos,

etc, formando-se em todas as superfícies inertes como o plástico, aço inoxidável, vidro, madeira, borracha, fórmica, ferro, mármore, granito, entre outras. O material mais usado na indústria alimentar é o aço inoxidável devido à sua elevada resistência mecânica e resistência a agentes desinfetantes como o hipoclorito de sódio, o ácido peracético, entre outros. É um material de fácil tratamento mecânico e eletrostático, sendo assim fácil de “alisar” para evitar a formação de biofilmes. Utiliza-se tanto em superfícies de processamento de alimentos como em tubagens ou ainda em equipamento. No entanto, fissuras, riscos, rachas, “pontos mortos”, cantos, válvulas, articulações e juntas, são pontos vulneráveis para a formação de biofilmes. Mangueiras, tubos ou filtros de cloreto de polivinilo (PVC) são ainda mais vulneráveis à formação de biofilmes do que o aço e são mais facilmente deterioráveis. Por outro lado, os biofilmes podem também ocorrer em matérias-primas, de origem animal ou vegetal. Dado o crescente interesse por dietas saudáveis, tem-se verificado um aumento da procura de produtos frescos por parte dos consumidores (frutas, verduras e legumes de fácil preparo e consumo). Neste sentido, a indústria de processamento mínimo de vegetais tem-se expandido, observando-se uma correlação positiva entre a intensificação do consumo destes alimentos e o aumento do número de surtos de intoxicações alimentares a eles relacionados.

A presença de biofilmes na indústria alimentar é particularmente problemática na indústria de laticínios; processamento de carnes vermelhas, de aves e de pescados; indústria cervejeira e na indústria de processamento de produtos frescos. Neste ponto serão destacadas as indústrias de laticínios, carnes e pescados.

A INDÚSTRIA DE LACTICÍNIOS

De entre as indústrias mais afetadas pode salientar-se a indústria de laticínios. Nesta indústria, patógenos alimentares provenientes

dos sistemas de ordenha, de origem fecal, das águas de lavagem das vacarias ou dos sistemas de armazenamento podem chegar às linhas de processamento e contaminar toda a linha, desde as tubagens, tanques de armazenamento do leite até ao próprio leite e derivados. A contaminação dos produtos lácteos já pasteurizados acontece nas máquinas de enchimento ou devido a biofilmes presentes nas juntas. Nesta indústria as superfícies de borracha constituem um ponto crítico. Num estudo de 1977, verificou-se que as peças de borracha da máquina de ordenha continham de 10 a 117 vezes mais bactérias do que as partes metálicas dessas mesmas máquinas. *Pseudomonas* são as principais bactérias Gram negativas responsáveis pela deterioração do leite através da produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas que degradam os componentes do leite. Muitas destas enzimas permanecem ativas, mesmo após as etapas de processamento térmico que podem destruir os microrganismos que as produzem, o que é completamente indesejável. A prevalência destas bactérias sobre outras (cerca de 50%) pode explicar-se pela sua capacidade de crescerem e de se multiplicarem a baixas temperaturas, nomeadamente, a temperaturas de refrigeração - são bactérias psicrotólicas.

Foram isoladas do leite outras bactérias Gram-negativas, sendo as espécies de *Enterobacter* e *Klebsiella* as mais frequentes. Segundo o mesmo estudo, também têm sido isoladas bactérias Gram-positivas, estando, no entanto, presentes em menor número. As espécies Gram positivas mais frequentes são os *Bacillus*, *Micrococcus* e *Arthrobacter*. Dentro deste último grupo é de salientar a importância dos *Lactobacillus* devido à sua grande capacidade de adesão e de formação de biofilme, e ainda porque algumas estirpes de *Lactobacillus lactis* são capazes de produzir 3-metilbutanal a partir da leucina, conferindo um sabor maltado ao leite. *L. monocytogenes* é uma bactéria pouco encontrada na indústria de laticínios mas que

constitui um grande desafio para os responsáveis pela segurança alimentar devido à sua relativamente elevada taxa de mortalidade. Têm sido isoladas repetidamente estirpes de *L. monocytogenes* em tanques de armazenamento de leite a granel, as quais têm demonstrado uma boa capacidade de formarem biofilme, resultando na contaminação de produtos alimentares. Como já foi referido, este fato resulta da sua natureza psicrófila e da sua capacidade de persistir nas superfícies durante muito tempo. Os surtos alimentares devido à ingestão de leite ou de derivados contaminados parecem ser, segundo os especialistas, devido a biofilmes, uma vez que ocorrem esporadicamente e não de uma forma contínua. Aconteceu, por exemplo, com os surtos devido a espécies de *Salmonella* presentes em leite em pó e a *L. monocytogenes* presente em queijo.

Mais recentemente, tem aumentado a preocupação com a contaminação por *Cronobacter spp.* na indústria de processamento de alimentos, principalmente de leite e fórmulas infantis desidratadas, com a colonização de equipamentos industriais. Já foi evidenciado que este patógeno é capaz de formar biofilme e pode colonizar tubos de alimentação e equipamentos utilizados no preparo dos alimentos infantis tais como escovas, liquidificadores e colheres.

A INDÚSTRIA DAS CARNES

Na indústria das carnes o perigo de contaminação começa logo com o abate dos animais. Nesta fase, a presença de matéria fecal dos animais abatidos pode contaminar a carne que vai ser processada e embalada com níveis elevados de bactérias, como *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* ou *L. monocytogenes*. Vários estudos têm demonstrado a presença de microrganismos patogênicos em carnes. Por exemplo, foram recolhidas amostras de carne picada de indústrias de carne ao longo de todos os EUA e verificou-se que 7,5% das amostras de carne estavam

contaminadas com *Salmonella*, 11,7% estavam contaminadas com *L. monocytogenes*, 30% com *Staphylococcus aureus* e 53,3% com *Clostridium perfringens*. Em termos de segurança alimentar, na indústria de carnes, *L. monocytogenes* é o microrganismo mais problemático devido à sua capacidade de sobreviver e até de crescer à temperatura de refrigeração, ou nos produtos de carne já prontos e embalados a vácuo ou em atmosfera modificada. De facto, verificou-se que esta bactéria pode ser encontrada em áreas de processamento de carne, mesmo com uma incidência muito elevada. A sua sobrevivência, que pode ser de anos, faz com que as linhas de processamento da carne possam ser contaminadas durante, por exemplo, o processo de corte.

A INDÚSTRIA DE PESCADOS

Na indústria de pescados há descrição da ocorrência de bactérias persistentes, indicando que microrganismos em biofilmes são importantes contaminantes nestes ambientes de processamento. Há dados sobre a prevalência de *L. monocytogenes* em peixe tropical surubim (*Pseudoplatystoma sp.*) defumado minimamente processado, que revelam que 5% das embalagens se encontram contaminadas com *L. monocytogenes*, tendo sido demonstrado por RAPD (do inglês Random Amplification of Polymorphic DNA – ver Capítulo 34) que as linhagens isoladas são do mesmo subtipo de linhagens isoladas na mesma fábrica há quatro anos.

Num estudo sobre a ecologia microbiana de diferentes indústrias processadoras de pescados foi demonstrado que os microrganismos predominantes em locais de processamento de salmão defumado a frio são *Pseudomonas*, *Neisseriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter* e bactérias lácticas, enquanto na produção de arenque semi-conservado são *Pseudomonas*, *Alcaligenes*. Por sua vez, na indústria processadora de salmão foram encontrados predominantemente *Enterobacteriaceae*, *Psychro-*

1 *bacter*, *Staphylococcus* e leveduras. Também se
2 detetou *Listeria* sp. em todas as indústrias de
3 pescado pesquisadas. Muitos destes microrga-
4 nismos eram contaminantes provenientes da
5 matéria-prima tendo-se observado que, mesmo
6 após limpeza e desinfecção, alguns destes micror-
7 ganismos ainda persistiam no local de processa-
8 mento, sendo essencial o aperfeiçoamento de
9 métodos de limpeza e desinfecção, considerando
10 principalmente os microrganismos mais persis-
11 tentes e potenciais contaminantes do produto.

12 Na identificação da microbiota aderida a su-
13 perfícies de processamento de camarão e peixe
14 e no estudo da adesão de *L. monocytogenes* e
15 bactérias Gram-negativas em superfícies de aço
16 inoxidável (sem tratamento, polidas e tratadas
17 com pérolas de vidro) verificou-se que os géne-
18 ros predominantes são *Pseudomonas* spp. (66%)
19 na indústria de camarão e *Enterobacteriaceae*
20 (27%) na indústria de peixe. Quando se analisou a
21 influência de culturas de microrganismos Gram-
22 negativos isolados de amostras da indústria de
23 camarão sobre a adesão de *L. monocytogenes* a
24 superfícies de aço inoxidável constatou-se que
25 o maior número de células aderidas foi obtido
26 com contaminação por cultura mista de *L. mo-*
27 *nocytogenes* e *Serratia liquefaciens*. Observou-se
28 ainda que a colonização por *L. monocytogenes*
29 aumentou significativamente na presença de
30 cultura mista de *Pseudomonas* spp.. Por outro
31 lado, verificou-se também que não houve
32 influência da rugosidade da superfície do aço
33 inoxidável na adesão bacteriana, pelo que se
34 concluiu que superfícies mais lisas não são ne-
35 cessariamente superfícies mais higiénicas.

36 37 38 18.4 >Fatores envolvidos 39 na formação de biofilmes 40 de *Listeria* e *Salmonella* 41

42 A adesão e formação de biofilmes bacterianos
43 depende de numerosos fatores, entre eles, fato-

res ambientais, morfológicos, fisiológicos e ge-
néticos que regulam e/ou afetam estes proces-
sos biológicos. Neste ponto serão apresentados
alguns dos fatores envolvidos na colonização de
superfícies e desenvolvimento de biofilmes de *L.*
monocytogenes e *S. enterica* Enteritidis.

LISTERIA MONOCYTOGENES

A capacidade que as células de *L. monocyto-*
genes têm para aderir e, subsequentemente,
formar biofilmes em superfícies bióticas e
abióticas em ambientes de processamento
alimentar tem sido bem documentada. Con-
tudo, tem-se notado a existência de diferenças
quer a nível da extensão e taxa de adesão quer
a nível da formação de biofilme dependendo
da superfície selecionada, pré-tratamento da
superfície alvo, condições ambientais e de
crescimento, pH, temperatura, etc.. Além disso,
foi já reportado que a maioria das estirpes de
L. monocytogenes poderá não formar biofilmes
em monocultura e não se encontrou nenhuma
relação entre a persistência em ambientes de
processamento, a origem da estirpe (alimentar
ou clínica) e o subtipo da estirpe (serótipo ou
linhagem) em relação à adesão e formação de
biofilme. Outros estudos focados na formação
de biofilme a longo-termo mostraram que
este é um organismo pobre no que respeita
à adesão e formação de biofilme, o que levou
a sugerir que estas estirpes poderão usar uma
bactéria colonizadora primária de uma espécie
diferente para formar um consórcio de biofilmes
numa superfície. Dois grupos de investigação
observaram que a formação de biofilme poderia
correlacionar-se com a divisão filogenética mas
não com o serótipo, tendo um deles constata-
do que as estirpes pertencentes à linhagem I
são significativamente melhores formadoras
de biofilme do que as estirpes da linhagem II,
sugerindo assim uma possível relação entre a
formação de biofilme e a divisão filogenética
mais estreitamente relacionada com os surtos

1 de origem alimentar. Contudo, o outro grupo
2 observou uma maior formação de biofilme por
3 parte de estirpes pertencentes à linhagem II
4 (serótipos 1/2a e 1/2c), as quais normalmente
5 não estão relacionadas com os surtos alimen-
6 tares. Estes resultados contraditórios poderão
7 dever-se a diferenças na metodologia, tamanho
8 da amostra e estirpes específicas usadas pelos
9 respetivos autores. Por outro lado, a relação
10 entre a formação de biofilme e a virulência de
11 *L. monocytogenes* permanece incerta.

12 Alguns estudos mostraram que para iniciar
13 o processo de adesão, esta bactéria serve-se
14 de flagelos, fímbrias e proteínas de membrana.
15 Os flagelos existentes na superfície das células
16 são um apêndice dinâmico que fornece mobi-
17 lidade celular e cuja presença está envolvida
18 no aumento da carga eletronegativa da *Listeria*.
19 Desta forma, a importância dos flagelos é levar
20 as bactérias para locais onde a adesão é poten-
21 ciada, em vez de atuarem como adsorventes
22 ou adesivos. Recentemente, caracterizaram-se
23 mutantes sem flagelos e mutantes com flagelos
24 paralisados, demonstrando-se que a mobilida-
25 de flagelar é fundamental para a formação de
26 biofilmes de *L. monocytogenes*.

27 Fatores ambientais, incluindo pH, tempera-
28 tura, composição de nutrientes e características
29 populacionais das bactérias, desempenham um
30 papel importante na alteração fenotípica aquan-
31 do da passagem das células planctónicas para
32 a forma séssil. Por exemplo, foi demonstrado
33 que a adesão máxima ao aço inoxidável a 30 °C
34 ocorreu a pH 7 para *L. monocytogenes* e pH 8 - 9
35 para *Y. enterocolitica*. Adicionalmente, foi suge-
36 rido que baixos valores de fosfatos estimulam
37 inicialmente a formação de biofilmes de *Listeria*.

38 No complexo processo de formação de
39 biofilme de *L. monocytogenes*, as expressões de
40 genes são diferentes daquelas encontradas em
41 células planctónicas. Numa análise proteómica
42 em biofilmes desta bactéria verificou-se a sobre-
43 regulação da síntese de 22 proteínas, enquanto

a síntese de outras 9 proteínas foi sub-regulada. Curiosamente, a expressão da proteína flagelina (FlaA) foi suprimida nos biofilmes, o que indica que esta proteína é sintetizada na adesão inicial e inibida durante o desenvolvimento do biofilme. Por outro lado, os níveis das duas enzimas essenciais para o metabolismo do carbono, piruvato desidrogenase (PdhD) e 6-fosfofructo- cinase, aumentaram nas células dos biofilmes, demonstrando que o metabolismo central de *L. monocytogenes* é afetado pelo desenvolvi- mento do biofilme. O agr (um gene regulador acessório) foi também alvo de estudos recentes sobre a formação de biofilme de *L. monocytoge- nes* e *S. aureus*. O sistema agr pode controlar a expressão de vários fatores de virulência e tem sido proposto como possível candidato para a formação de biofilme. Foi também descrito o operão agrBDCA em *L. monocytogenes*, tendo- se verificado que a deleção *in frame* dos genes *agrA* e *agrD* resulta em alterações na adesão e na formação de biofilme em superfícies abióticas. Estas observações sugerem que o sistema agr está envolvido nas primeiras fases da formação de biofilme. Num estudo em que se investigou a capacidade de *L. monocytogenes* selvagem e seus mutantes isogénicos para os genes *cwhA*, *prfA*, *agrA*, *flaA*, *degU*, *ami* e *sigB*, de aderir e for- mar biofilmes em superfícies abióticas verificou- se que a inativação de dois componentes do sistema *degU* aboliu completamente a formação de biofilmes, enquanto mutações nos genes *flaA*, *agrA* e *ami* causaram diminuição da adesão inicial de *L. monocytogenes*. Os mutantes para o gene regulador de virulência *prfA* e fatores sigma alternativo (*sigB*) não tiveram a capacidade de formação de biofilmes afetada.

SALMONELLA ENTERICA ENTERITIDIS

Durante as últimas três décadas, *Salmonella enterica* Enteritidis tem emergido como um dos mais significativos patogénicos de origem

1 alimentar. É importante referir que a maioria
2 das estirpes deste organismo consegue crescer
3 em superfícies e interfaces e formar biofilmes
4 constituídos por exopolissacarídeos, ou material
5 exopolimérico, auto-excretados, inclusivamente
6 nos ambientes de processamento alimentar e
7 superfícies de contato com os alimentos. Células
8 de *S. Enteritidis* têm-se mostrado capazes de
9 formar biofilme em materiais de natureza distinta
10 e sob diferentes condições de crescimento, e vá-
11 rios estudos mostraram diferenças significativas
12 entre serovares no que respeita à formação de
13 biofilme, o que indica que a capacidade para
14 formar biofilme é importante para a persistência
15 das bactérias nos ambientes de processamento
16 alimentar.

17 Foi descoberto que em meio de cultura rico
18 e temperatura ambiente (28 °C) esta bactéria
19 produz uma película cuja matriz é maioritaria-
20 mente composta por curli, ou fímbrias agre-
21 gativas, e celulose, sendo atualmente aceite
22 que finas fímbrias agregativas (Tafi, do inglês
23 Thin Aggregative Fimbriae) e celulose são dois
24 importantes componentes da matriz dos bio-
25 filmes de *Salmonella*. De fato, as células de *S.*
26 *Enteritidis* possuem um apêndice na superfície
27 celular (fímbrias SEF-17) que facilita a adesão a
28 superfícies inanimadas e que fornece resistência
29 às células contra forças mecânicas. As Tafi são
30 fibras amiloides e estão envolvidas na adesão a
31 superfícies, agregação celular, persistência am-
32 biental e desenvolvimento de biofilme. Por seu
33 lado, o segundo componente da matriz extrace-
34 lular dos biofilmes de *Salmonella* - a celulose - é
35 biossintetizado pelos genes *bcsA*, *bcsB*, *bcsZ* e
36 *bcsC* (sendo que “bcs” se refere a Bacterial Cellu-
37 lose Synthesis). Alguns estudos recentes sobre o
38 processo de formação de biofilme revelaram que
39 *Salmonella* e *E. coli*, assim como muitas outras es-
40 pécies da família *Enterobacteriaceae*, produzem
41 celulose como componente fundamental da
42 matriz extracelular bacteriana e cuja formação
43 é essencial para a sobrevivência das bactérias no

meio ambiente. A síntese de ambos os compo-
nentes (Tafi e celulose) são co-regulados por um
sistema regulatório complexo. A co-expressão
de finas fímbrias agregativas e celulose leva à
formação de uma rede altamente hidrofóbica
com células muito compactadas alinhadas em
paralelo numa matriz rígida.

Ao contrário do que acontece com outras
bactérias Gram-negativas, nas quais se demons-
trou que vários fatores relacionados com as
superfícies ou com a adesão intercelular estão
envolvidos na formação de biofilme, acreditava-
se, até há algum tempo atrás, que apenas as Tafi
e a produção de celulose estivessem envolvidas
no processo de formação de biofilme de *S.*
enterica. Contudo, estudos posteriores demons-
traram que uma grande proteína associada à
parede celular – BapA -, a qual é secretada e
cuja sequência tem homologia com a proteína
Bap (do inglês Biofilm-Associated Protein) de *S.*
aureus, é também necessária para a formação
de biofilme e colonização do hospedeiro. Foi
ainda demonstrado que a expressão do gene
bapA está coordenada com a expressão de Tafi e
celulose através da ação da proteína AgfD, tendo
a disrupção de algum dos dois operões respon-
sáveis pela biossíntese da celulose – *bcsABZC* e
bcsEFG – prejudicado a formação da película e
aumentado significativamente a suscetibilidade
de *S. Enteritidis* aos desinfetantes.

18.5 > Adesão e formação de biofilmes de *Salmonella* e *Listeria* em aço inoxidável

A adesão e formação de biofilmes bacterianos
em superfícies de contato com alimentos têm
sérias implicações na higiene, uma vez que
células aderidas e em biofilme têm uma resis-
tência acrescida contra fatores de *stress* comu-
mente usados na descontaminação das ditas

superfícies. São numerosos os estudos sobre o comportamento de células de *L. monocytogenes* e de *S. enterica*, alguns dos quais mostraram que ambas as bactérias são capazes de aderir a diferentes materiais de contato com alimentos, como por exemplo metais, plásticos, vidros e madeiras. Como já foi referido anteriormente, entre as várias superfícies existentes, o aço inoxidável tem sido o material mais utilizado para construção de superfícies de trabalho e bancas de cozinha devido à sua facilidade de fabrico, força mecânica, resistência à corrosão e durabilidade. Neste contexto, e considerando a elevada importância destas espécies bacterianas no âmbito da contaminação alimentar, serão aqui apresentados resultados de estudos sobre a capacidade de adesão e formação de biofilme de *L. monocytogenes* e *S. enterica* no aço oxidável.

HIDROFOBICIDADE E RUGOSIDADE DO AÇO INOXIDÁVEL

A adesão de células a superfícies é a etapa inicial e determinante na formação de um biofilme. Trata-se de um fenómeno que ocorre naturalmente em meio aquoso e que depende de vários fatores, entre os quais se encontram as propriedades superficiais (carga superficial e hidrofobicidade) e a morfologia (rugosidade e porosidade) da superfície dos materiais. Duas dessas propriedades – a hidrofobicidade e a rugosidade – foram avaliadas em relação ao aço inoxidável 304. A hidrofobicidade de uma superfície traduz a sua afinidade/repulsão em relação à água. Tem-se observado que em solução aquosa a adesão entre superfícies é favorecida se ambas são hidrofóbicas e especialmente quando o filme de água que separa essas superfícies é removido, processo facilitado pela hidrofobicidade das superfícies que interagem. Por outro lado, a rugosidade está relacionada com a topografia do material podendo aumentar/reduzir a área superficial

de contato e potenciar/restringir a existência de locais protegidos favoráveis à colonização microbiana. É possível determinar-se a hidrofobicidade de uma superfícies através da medição do ângulo de contato com a água, enquanto a rugosidade e a topografia podem ser analisadas através de microscopia de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*).

Os ângulos de contato com a água podem ser usados como indicadores qualitativos da hidrofobicidade quer de células quer de superfícies (ver Capítulos 26 e 29). De acordo com o critério de Vogler, superfícies hidrofóbicas (com baixa afinidade pela água) exibem ângulos de contato com a água superiores a 65°, enquanto valores inferiores a este indicam que o material tem características hidrofílicas (tem alta afinidade com a água). Resultados da medição dos ângulos de contato sobre os cupões de aço inoxidável 304 mostram que este material apresenta um valor médio de $90,4 \pm 2,9^\circ$, o que permite classificá-lo como sendo hidrofóbico. Assim, a superfície em questão revela-se de uma forma geral propensa à colonização bacteriana.

Tal como acima mencionado, um outro fator que pode influenciar a adesão e subsequente desenvolvimento de biofilme é a rugosidade das superfícies. De fato, num estudo em que foi investigada a adesão bacteriana a três superfícies de aço inoxidável com diferentes tipos de acabamento (jacto de areia, areia e eletropolimento) verificou-se que o aço inoxidável eletropolido era o material que não só apresentava a superfície menos rugosa mas também o que apresentou menor número de células aderidas. Medições quantitativas da rugosidade e da topografia de superfícies podem ser realizadas por meio da técnica de microscopia de força atômica, já que este é um dos mais avançados instrumentos para imagem, medição e manuseamento à nanoescala, permitindo caracterizar com muita precisão a topografia de superfícies e obter o valor da rugosidade média (R_a - média das alturas

dos picos e profundidades dos vales). Em relação ao aço inoxidável 304, este material apresenta um valor médio de $30,9 \pm 4,4$ nm de rugosidade, tendo as imagens topográficas revelado uma superfície com sulcos e fendas pronunciadas mas distribuídos segundo um padrão regular (figura 18.1). Tal como sucedeu em relação à hidrofobicidade, estes dados permitem caracterizar este material como sendo (pelo menos teoricamente) propenso à colonização microbiana.

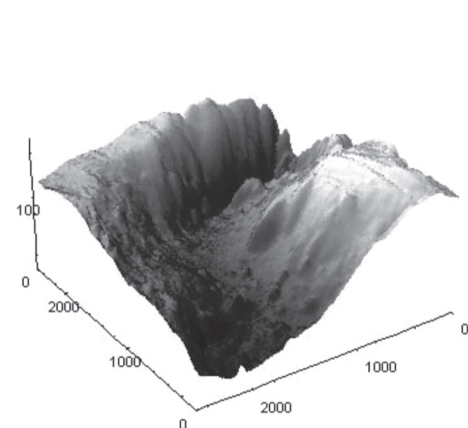


Figura 15.1 > Imagem tridimensional da topografia da superfície do aço inoxidável 304.

ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *SALMONELLA ENTERITIDIS*

A colonização bacteriana de superfícies de aço inoxidável tem sido largamente estudada. No que respeita à adesão e formação de biofilme de *S. Enteritidis* sobre cupões de aço inoxidável 304 sabe-se que diferentes estirpes desta espécie bacteriana são capazes de aderir e proliferar no material em questão (figura 18.2), confirmando assim o pressuposto feito com base na caracterização da superfície deste material.

Este tipo de estudos permite determinar até que ponto uma superfície de contato com alimentos é passível de ser colonizada por agentes patogénicos e servir de base à formação de biofilmes. Ao comprovar-se a capacidade dos patogénicos em aderir e proliferar nesses materiais reforça-se a necessidade de cuidados redobrados em termos de limpeza e desinfeção dos mesmos a fim de minimizar a ocorrência de fenómenos altamente indesejáveis, como são a contaminação dos produtos alimentares (por via direta ou por contaminação cruzada) e os surtos de origem alimentar que tantas vezes assolam a saúde pública.

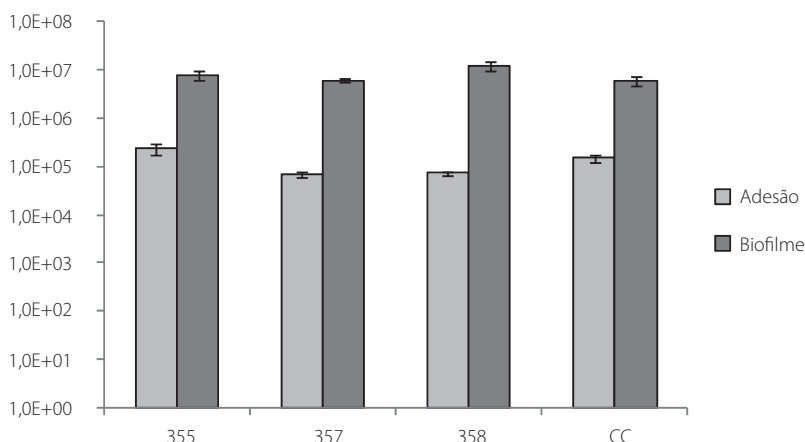


Figura 18.2 > Adesão e formação de biofilme por parte de quatro estirpes de *S. Enteritidis* em cupões de aço inoxidável 304.

ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Há vários trabalhos sobre a persistência de *L. monocytogenes* em ambiente e equipamentos de processamento de alimentos. A figura 18.3 ilustra a adesão de *L. monocytogenes* a uma superfície de aço inoxidável.

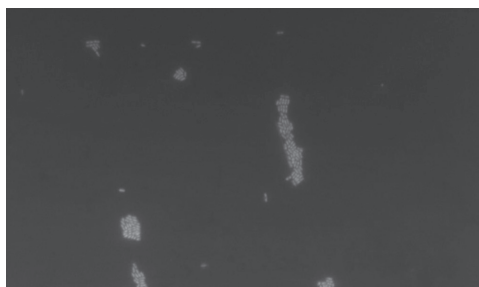


Figura 18.3. Microfotografia obtida em microscopia de epifluorescência mostrando adesão de *L. monocytogenes* ATCC 19115 a lâmina de aço inoxidável (ASI 304). Amplificação: 100 x (autoria: Fernanda Barbosa dos Reis).

Num estudo sobre o efeito de nisina e de duas linhagens de *Enterococcus faecium* (produtora e não produtora de bacteriocina, bac+ e bac-) sobre a formação de biofilmes em lâminas de aço inoxidável por *L. monocytogenes* cultivada em meio BHI (do inglês Brain Heart Infusion), os resultados obtidos na quantificação das populações bacterianas aderidas e as respectivas imagens de microscopia eletrônica de varrimento demonstraram que *E. faecium* bac+ foi mais eficiente em reduzir a formação de biofilmes por *L. monocytogenes*, em comparação com a linhagem bac-. A bacteriocina nisina também reduziu a formação de biofilmes (9h de incubação), mas verificou-se crescimento novamente após 24 e 48 horas.

Quando se avaliou a capacidade de *L. monocytogenes* aderir ao aço inoxidável na presença da cultura produtora de bacteriocina *Lactobacillus sakei* 1 e de sobrenadante livre de células

desta cultura contendo a bacteriocina (CFSN-1) foi observado que co-cultura com *L. sakei* 1 diminuiu o número de células de *L. monocytogenes* aderidas às lâminas de aço durante todo o período de incubação (48h) e que CFSN-S1 causou inibição do patogênico em 24h. No entanto, após 48h houve crescimento novamente de *L. monocytogenes*. *L. sakei* ATCC 15521 não produtor de bacteriocina, ou seu sobrenadante, utilizados como controles não foram capazes de inibir o patogênico. Esses resultados indicam que bacteriocinas podem ser úteis como estratégias de controle de patogênicos, especialmente para inibir estágios iniciais de adesão bacteriana.

Numa investigação sobre a capacidade de *Leuconostoc mesenteroides* (produtor e não produtor de bacteriocina (bac+ e bac-, respectivamente)) em inibir a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em cupões de aço inoxidável, na presença ou não de sacarose, foi observado que *Leuconostoc mesenteroides* bac+ em co-cultura com *L. monocytogenes* foi eficaz na inibição da adesão inicial (até 3h), mas após 24h foi formado biofilme em todas as condições testadas. Constatou-se ainda que, quando foi realizada co-cultura com *L. mesenteroides* bac+ em BHI com sacarose, as células de *L. monocytogenes* observadas sob microscopia eletrônica de varrimento apresentavam formato alongado. Estas células alongadas podem apresentar maior capacidade de adaptação ao stress e podem dividir-se em células simples e multiplicar-se rapidamente em condições favoráveis, representando uma preocupação para a inocuidade de alimentos.

A avaliação do uso de óleos essenciais combinados ou sozinhos de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus*, permitiu concluir que esses antimicrobianos naturais podem ser úteis na desinfecção de superfícies de aço inoxidável em indústrias contaminadas por *L. monocytogenes*. Outra alternativa testada recentemente para o controle da formação de biofilmes é o uso de biosurfatantes, que são moléculas ativas na

1 superfície microbiana sintetizadas por micror-
2 ganismos. Os surfatantes de origem microbiana
3 mais conhecidos são os ramnolípidios de *P. ae-*
4 *ruginosa*, surfactina de *Bacillus subtilis*, emulsana
5 de *Acinetobacter calcoaceticus* e soforolípideos
6 de *Candida bombicola*. Testes sobre a ação dos
7 biosurfactantes surfactina e ramnolípideo em lâ-
8 minas de polipropileno e de aço inoxidável sobre
9 *L. monocytogenes*, *Cronobacter spp.* e *Salmonella*
10 *Enteritidis* revelaram que a surfactina inibiu sig-
11 nificativamente a adesão de *L. monocytogenes*
12 e de *Cronobacter spp.* em ambas as superfícies
13 testadas. Entretanto, verificou-se que a redução
14 da adesão de *S. Enteritidis* foi somente na super-
15 fície de polipropileno. No mesmo estudo, foi
16 observado que o biosurfatante ramnolípideo
17 não foi capaz de reduzir significativamente o
18 número de células aderidas dos patogénicos
19 testados em ambas as superfícies sólidas.

22 18.5 > Conclusões

24 A colonização das superfícies de processamento
25 de alimentos, e consequente formação de bio-
26 filmes, pode ocasionar diversos problemas na
27 indústria alimentar, tanto de ordem económica
28 como de saúde pública. Para se evitar essa ade-
29 são de microrganismos patogénicos e formação
30 de biofilmes nas diversas superfícies, têm que ser
31 tomadas várias medidas, tais como: um projeto
32 adequado dos equipamentos, a implementação

de técnicas mais efetivas de monitorização de
biofilmes, a inspeção visual constante da acumu-
lação de biofilme, o desenvolvimento de novos
desinfetantes e de protocolos de desinfecção
mais eficientes, o desenvolvimento de superfí-
cies com uma maior capacidade antimicrobiana
através da modificação das suas propriedades
superficiais como a hidrofobicidade e/ou a
rugosidade e a incorporação de produtos anti-
microbianos nas próprias superfícies, como é o
caso dos silestones (materiais constituídos por
quartzo com um biocida – Microban – incorpo-
rado). O uso de ferramentas como a Avaliação
de Risco Microbiológico (MRA, do inglês Micro-
biological Risk Assessment) e Análise de Perigos
e Pontos Críticos de Controlo (HACCP, do inglês
Hazard Analysis and Critical Control Point) e a
implementação de Boas Práticas de Fabricação
(GMP do inglês Good Manufacturing Practice -)
em todas as indústrias alimentares é crucial. A
utilização de métodos de avaliação da eficiência
de procedimentos de limpeza e sanitização na
indústria de alimentos como o método de CIP
(do inglês Clean In Place) - em que é realizada
a limpeza de equipamentos sem que sejam
desmontados – combinado com escovação
mecânica e aplicação de agentes químicos,
por ex. detergentes e enzimas, reduz tempo e
custo de operação na indústria de alimentos,
tem também que ser universal. Espera-se, deste
modo, que a segurança do consumidor possa
ser uma realidade.

NO FINAL DA LEITURA DESTE CAPÍTULO, O LEITOR DEVE:

- › Identificar os principais patogênicos alimentares;
- › Reconhecer o impacto negativo dos biofilmes na indústria alimentar;
- › Identificar as principais indústrias alimentares afetadas por biofilmes;
- › Identificar diferentes fatores envolvidos na formação de biofilmes de *Listeria* e *Salmonella*;
- › Reconhecer a importância das principais propriedades superficiais na adesão e formação de biofilmes;
- › Identificar as principais medidas de prevenção de contaminação na indústria alimentar.

LEITURA RECOMENDADA

Alves, V.F., De Martinis, E.C.P., Destro, M.T., Vogel, B.F. and Gram, L. (2005), *Journal of Food Protection* 68:2068-2077.

Bacon, R. T. and Sofos, J. N., in: R.H. Schmit and G.E. Rodrick (eds), edited by John Wiley & Sons, New Jersey, 2003, pp. 157-195.

FDA. Food and Drug Administration. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. The "Bad Bug Book". 2011. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/default.htm>

<http://www.cdc.gov/media/pressrel/2010/r101215.html>

Minei, C.C., Gomes, B. C., Ratti, R.P., D'Angelis, C.E.M. and De Martinis, E. C. P. (2008), *Journal of Food Protection* 71:634–638.

Ratti, R.P., Gomes, B. C., Martinez, R. C.R., Souza, V.M. and De Martinis, E.C.P. (2010), *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 30:1011-1016.

Rodrigues, D., Teixeira, P., Oliveira, R. and Azeredo, J. (2011), *Journal of Food Protection* 74: 32-37.

Teixeira, P., Lopes, Z., Azeredo, J., Oliveira, R. and Vieira, M. J. (2005), *Food Microbiology* 22:247-251.

WHO. World Health Organization. Foodborne Disease Surveillance. 2011. Disponível em: http://www.who.int/foodborne_disease/burden/en/index.html

Winkelströter, L. K., Gomes, B.C., Thomaz, M.R.S., Souza, V.M. and De Martinis, E.C.P. Food Control, doi:10.1016/j.foodcont.2011.02.021 (in press).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43